

Aus der Hämathologischen Abteilung

(Leiter: Professor Dr. H. Gerhartz)

der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin

im Städtischen Krankenhaus Westend

Direktor: Professor Dr.med. Dr.sc.h.c. Dr.med.vet.h.c. Dr.med.h.c. Hans Frhr. v. Krefß

QUANTITATIVE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON
TRIÄTHYLENTHIOPHOSPHORAMID UND AMETHOPTERIN AUF
DIE CHROMOSOMENMORPHOLOGIE IN VITRO

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dieter Rösch

aus Kirchheim-Teck

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Hämatologischen Abteilung (Leiter: Prof. Dr. H. Gerhartz)
der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin im
Städtischen Krankenhaus Westend (Direktor: Professor Dr. med.
Dr. sc. h. c. Dr. med. vet. h. c. Dr. med. h. c.
Hans Frhr. v. Krefß

QUANTITATIVE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON
TRIÄTHYLENTHIOPHOSPHORAMID UND AMETHOPTERIN AUF
DIE CHROMOSOMENMORPHOLOGIE IN VITRO

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität
Berlin

vorgelegt von
Dieter Bösch

aus Kirchheim-Jech

Dekan: Professor Dr. med. H.W. S p i e r
Referent: Professor Dr. med. H. G e r h a r t z
Korreferent: Professor Dr. med. H.-J. D u l c e



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26. März 1968

I n h a l t

Einleitung	Seite 1
Literaturübersicht	" 2
Methodik	" 8
Bewertung der Chromosomenanomalien	" 11
Ergebnisse	" 13
Zusammenfassung	" 32
Literaturverzeichnis	" 34

E i n l e i t u n g

Bei der Behandlung von malignen Tumoren und Hämoblastosen werden Zytostatika in großem Umfang angewandt. Es war daher von Interesse, die Wirkung zweier Substanzen auf die Morphologie menschlicher Leukozytenchromosomen quantitativ zu untersuchen. Dabei war insbesondere die Frage zu klären, ob unterschiedliche chromosomale Veränderungen durch Zytostatika mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus induziert werden. Ausgewählt wurden deshalb die alkylierende Substanz Triäthylenthio-phosphoramid (Thiotepa) und der Folsäure-antagonist Amethopterin (Methotrexat).

Bei der Bewertung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß eine große Anzahl von zytostatisch wirksamen Substanzen an pflanzlichen und tierischen Testobjekten bereits früher geprüft wurden. Auch erlauben spezielle genetische Untersuchungsmethoden einen weitaus tieferen Einblick in die Veränderungen z.B. des genetischen Materials als dies durch morphologische Untersuchungen an menschlichen Leukozytenchromosomen derzeit möglich ist.

L i t e r a t u r ü b e r s i c h t

Als Zytostatika werden nach HEILMEYER(28) chemische Verbindungen bezeichnet, die das Wachstum von Zellen, insbesondere auch von malignen Tumoren und Hämoblastosen zu hemmen vermögen. AUERBACH(4) beschrieb als erste im Jahre 1943, daß Zytostatika mutagen wirksam sein können. Bei der Prüfung von Senfgas an *Drosophila* fand sie, daß die Mutationsrate deutlich gegenüber der Rate der Spontanmutationen bei unbehandelten Kontrollen erhöht war. Seither sind viele zytostatisch wirksame Substanzen an biologischen Testobjekten mit verschiedenen genetischen und zytogenetischen Methoden geprüft worden. Unter vielen anderen wurden folgende Verbindungen getestet: Stickstofflost: AUERBACH u. FALCONER 1949 an der Maus(5), FORD 1948(25) an *Vicia faba*, KOLLER u. CASARINI 1952(36) an Walker-Marzinom der Maus, REVELL 1953(58) an *Vicia faba* und WITTELMILL 1948(68) an *Drosophila*, Sarkolysin: BIRD 1950(13) an *Drosophila*, Chlorambucil: von MURPHY, MORO u. LACON 1958(51) an Ratten- und Hühnerembryonen, Melphalan: von FAHEY u. FAHEY 1960(24) an *Drosophila*, Endoxan: ARRIENTI, HSU u. BERGHAEL 1962(3) an ELD-Aszitestumor der Maus, MICHAELIS u. RIEGER 1961(46) an *Vicia faba*, Chinon I: BELTZ 1959(8) und LÜERS 1956(41) beide an *Drosophila*, Fristylenmelamin: BAFEMAN 1960(7) an der Maus, BUIATTI u. RONCHI 1963(15) an *Vicia faba*, CAPTANACH 1957(16) an der Maus, FAHEY u. FAHEY 1955(23) an *Drosophila*, MICHAELIS u. RIEGER 1963(47) an *Vicia faba*, OCKEY 1957(56) an *Vicia faba*, WAKOJIG u. ARABO 1959(67) an *Vicia faba*. Myleran: MICHAELIS u. RIEGER 1960(45) an *Vicia faba*, RÖHRBORN 1959(59) an *Drosophila*, und viele weitere alkylierende Substanzen. Die in dieser Arbeit getestete Substanz F a i o t e p a wurde bereits von LÜERS 1959(42) an *Drosophila* geprüft.

Eine weitere Gruppe der Zytostatika bilden die Antibiotika. U. a. wurden geprüft: Aktinomycin D: ARRIGHI u. HSU 1965 (3) am Chinesischen Hamster, MUKHERJEE 1965(50) an *Drosophila*, SUZUKI 1963(61) an *Drosophila*, Mitomycin C: MERZ 1961(44) an *Vicia faba*.

Zu den Antimetaboliten gehören u.a. die Halogenderivate des Uracils und des Desoxyuridins und die Folsäureantagonisten. Nach LÜERS u. RÜHRBORN 1961(43) wirkt 5-Bromuracil bei *Drosophila* nicht mutagen. Dagegen wurden Chromosomenveränderungen nach 5-Fluordesoxyuridin von BELL u. WOLFF 1964(10) an *Vicia faba*, von KIHLMAN 1962(33), 1962(32) und 1963(34) ebenfalls an *Vicia faba* und an demselben Testobjekt auch von TAYLOR, HAUT u. TUNG 1962(64) beschrieben. Die Wirkung von Desoxyadenosin untersuchte KIHLMAN 1963(34) bei *Vicia faba*. Folsäureantagonisten sind Aminopterin und Amethopterin. Während Aminopterin nach TAYLOR 1963(62,63) bei *Vicia faba* Chromosomenmutationen induzierte, konnte bei Amethopterin nach LÜERS u. RÜHRBORN 1961(43) an *Drosophila* keine mutagene Wirkung beobachtet werden.

Bei menschlichen Chromosomen wurde die Wirkung ionisierender Strahlen eingehend untersucht, so unter vielen anderen: BELL u. BAKER 1962(9), BENDER u. GOOCH 1962(11), BENDER u. GOOCH 1963(12), BÜCK, FRACCARO, FREDGA u. LINDSTEN 1962(14), CHU, GILES u. PASSANO 1961(17), LINDGREN u. NORRBYD 1962(38), TOUGH, BUCKTON, BAIRIE u. COURT BROWN 1960(65), u.a.

Brüche nach Kälteeinwirkung beschrieben HAMPEL u. LEVAN 1964(27), nach Vireninfektionen u.a. NICHOLS, LEVAN, HALL u. ÖSTERBERG 1962(53), STICH, HSU u. RAPP 1964(60), AULA 1963(6). JACKSON schließlich berichtete 1964(30) über Chromatidveränderungen nach 8-Äthoxykoffein in vitro.

Folgende Publikationen, die sich mit der Wirkung von Zytostatika auf die Morphologie menschlicher Chromosomen befassen, konnten gefunden werden:

1. CONN u. DASARI berichteten 1961(21) über Strukturveränderungen der Chromosomen bei einem Patienten, der wegen eines Bronchuskarzinoms mit Stickstofflost behandelt worden war.
2. WAHRMAN, SCHAP u. ROBINSON(26) beschrieben 1962 Chromosomenveränderungen bei einer Patientin mit einer fraglichen myeloischen Leukämie, die im Anschluß an eine Polycythaemia vera aufgetreten sein soll. Da aber zuvor eine nicht näher erläuterte Strahlenbelastung durch Ganzkörperbestrahlung, Radiophosphor, Radiojod und durch eine Milzbestrahlung stattgefunden hatte, können die beschriebenen Chromosomenveränderungen nicht allein auf die vor der Chromosomenanalyse durchgeführte zytostatische Therapie mit Myleran bezogen werden, da nach BENDER u. GOOCH 1962(11) strahleninduzierte Chromosomenveränderungen noch lange Zeit bestehen bleiben können.
3. Auch für die Untersuchungen von ARRIGHI, HSU u. BERGSAGEL 1962(3) gilt ähnliches. Zwar wurden Ergebnisse einer Chromosomenanalyse bei 4 Patienten im Anschluß an eine Endoxantherapie zusammengestellt, jedoch läßt sich auch daraus der Einfluß des Zytostatikums nicht sicher erkennen, da diese Patienten sämtlich vorher mit Tumordosen bestrahlt wurden. Lediglich ein Patient wurde allein mit Endoxan behandelt, die Bruchfrequenz pro Metaphase betrug bei ihm 0,17 im Mittel.

4. Ein klinisch nicht verwandtes Zytostatikum, Streptonigrin, untersuchte COHEN 1963(18), sowie COHEN, SHAW, CRAIG 1963(20). Quantitativ erfaßt wurden die zytogenetischen Veränderungen dieser Substanz auf menschliche Leukozytenchromosomen in vitro. Die Chromosomen Nr. 1-3 der Denver Nomenklatur(22) wurden in jeweils 11 gleichgroße Abschnitte eingeteilt und die Bruchzahl jener Abschnitte gesondert ermittelt. Es zeigte sich eine ungleichmäßige Verteilung der Brüche in diesen Abschnitten. Im übrigen wurde die mittlere Bruchfrequenz bei den Kulturen auch in Abhängigkeit von der verwandten Konzentration des Zytostatikums ermittelt. Es wurden u.a. Chromatidbrüche, Isochromatidbrüche, azentrische Fragmente, dizentrische Chromosomen, Translokationen u.a. beobachtet.
5. Gleichfalls klinisch nicht gebräuchlich sind die Substanzen β -Merkaptoäthanol und β -Merkaptopyruvat, deren zytogenetischen Veränderungen an menschlichen Leukozyten JACKSON 1963(29) und JACKSON u. LINDAHL-KIESSLING 1963(31) beschrieben haben.
6. KIRLMAN, NICHOLS u. LEVAN zeigten 1963(35), daß Desoxyadenosin und Zytosinarabinsid in vitro menschliche Chromosomen zu schädigen vermögen.
7. KRONE, WOLF u. FOULADYAND untersuchten 1963(37) die Wirkung von Hydroxylamin und Bromdesoxyuridin auf die Chromosomen bei menschlichen Fibroblastenkulturen. In den verschiedenen Segmenten der Chromosomen Nr. 1 - 15 wurde nach diesen beiden Substanzen wiederum keine gleichmäßige Verteilung der Chromatidveränderungen gefunden.

8. COHEN u. SHAW testeten Mitomycin C an menschlichen Leukozyten im Jahre 1964(19). Die gefundenen Brüche waren vorwiegend in den Regionen der sekundären Konstriktionen lokalisiert. Es wurde in Abhängigkeit von der Konzentration ein Anstieg der Bruchfrequenz beobachtet.
9. HAMPEL u. GERHARTZ(26) führten quantitative Untersuchungen an menschlichen Leukozytenchromosomen durch, wobei die Wirkung von Triäthylenmelamin (TEM) getestet wurde. Es konnte gezeigt werden, daß die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase annähernd linear, der Prozentsatz der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen exponentiell mit der Konzentration in vitro anstieg.
10. NICHOLS wies 1964(52) an menschlichen Leukozyten in vitro nach, daß auch Arabinosyladenin Brüche und achromatische Läsionen verursacht.
11. Die Lokalisation der durch Desoxyadenosin und Zytosin-arabinosid induzierten Brüche untersuchten 1964 NICHOLS, LEVAN u. KIHLMAN(54). Es ist bemerkenswert, daß die meisten Brüche in den telomernahen Abschnitten der Chromosomen gefunden wurden.
12. MOORE, VAN CAMPENHOUT u. BRANDKAMP ver öffentlichen im gleichen Jahre (48) Ergebnisse von Chromosomenanalysen bestrahlter und zytostatisch behandelter Patienten. Bei den verschiedenen Patientengruppen konnten nur bei vorausgegangener Bestrahlung Chromosomenanomalien gefunden werden, nicht jedoch bei den Patienten, die allein mit Zytostatika behandelt worden waren. Es ist allerdings anzumerken, daß jeweils nur 35 Metaphasen pro Kultur ausgewertet wurden.

13. NOWELL beschrieb 1964(55) gleichfalls Chromosomenveränderungen nach Mitomycin C. Erfasst wurden die Chromosomenveränderungen nach verschiedenen Einwirkungszeiten.
14. OSTERTAG u. KERSTEN beobachteten 1965(57), daß die von Proflavin und Aktinomycin D verursachten Chromosomenaberrationen annähernd linear mit der Dosis anstiegen. Die Brüche wurden vorwiegend in den perizentrischen Regionen gesehen.
15. Über qualitative Chromosomenveränderungen nach Trenimon, SPI, Leukeran u.a. Zytostatika berichtete ABAD 1965(1). Insbesondere nach Trenimontherapie wurden zahlreiche Brüche beobachtet.

M e t h o d i k

Folgende Zytostatika wurden in vitro getestet:

1. N, N', N'' - Triäthylthiophosphoramid,
Thiotepa, TESPA (Lederle)
Formel s. Abbildung 1

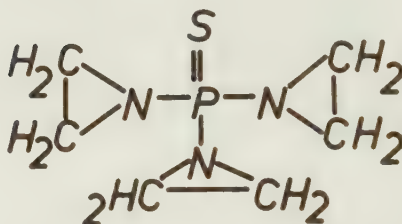
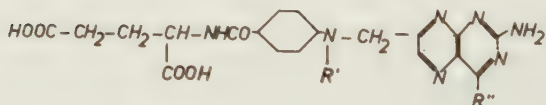


Abbildung 1
Strukturformel von Thiotepa

2. 4-Amino-N¹⁰-methylpteroylglutaminsäure,
Amethopterin, Methotrexat (Lederle)
Formel s. Abbildung 2



Folsäure	R' H	R'' OH
Amethopterin	CH ₃	NH ₂
Aminopterin	H	NH ₂

Abbildung 2
Strukturformel des Amethopterin

Insgesamt 60 Kurzzeitkulturen peripherer Leukozyten von 18 Patienten wurden nach der Methode von MOORHEAD u. Mitarb. (49) ausgewertet. Jeder Kulturserie lief mindestens eine Kontrolle parallel, erstens um die seltene, erblich bedingte erhöhte Chromosomenbrüchigkeit, zweitens um eine erhöhte Bruchfrequenz bei klinisch nicht erfaßtem Virusinfekt und drittens um Chromosomenbrüche bei ganz vereinzelt vorkommender bakterieller Kontamination der Kulturen auszuschließen.

Folgende Patienten dienten als Leukozytenspender:

	<u>Alter</u>	<u>klinische Diagnose</u>
1. B.E.	55	Fettzirrhose der Leber
2. B.U.	23	Streptokokkenangina
3. D.E.	58	Vorderwandinfarkt
4. G.E.	85	Ulcus ventriculi
5. H.G.	55	atrophische Gastritis
6. H.G.	75	vaskulärer Myokardschaden
7. J.H.	75	asthmoider Emphysebronchitis
8. K.E.	54	unklare Thrombozytopenie
9. K.K.	22	normazide Gastritis
10. L.P.	72	Vorderwandinfarkt
11. L.H.	52	kombiniertes Mitralvitium
12. L.A.	64	Vorderwandinfarkt
13. M.H.	70	Bronchopneumonie
14. M.P.	57	Leberzirrhose
15. R.E.	44	Ulcus duodeni
16. S.C.	62	Myokardinfarkt
17. S.G.	56	Vorderwandinfarkt
18. W.E.	63	dekomp. Myokardschaden

Keiner dieser Patienten wurde zuvor bestrahlt oder zytostatisch behandelt, auch wurden solche mit Verdacht auf floriden Virusinfekt ausgeschlossen.

Ansatz der Kulturen:

Unter sterilen Bedingungen wurde 30 ml heparinisiertem Venenblut 0,06 ml Baktrophythämagglutinin (zur Mitosestimulation und Erythrozytenagglutination) zugesetzt und 30 Minuten einer Temperatur von 2-4°C ausgesetzt. Die in dem abgehoenen Überstand nach dem Zentrifugieren (400 UpM, 10 Min. bei Zimmertemperatur) enthaltenen Leukozyten wurden in der Schillingkammer gezählt. Das rechnerisch ermittelte Volumen der Leukozytensuspension, in dem 10⁷ Leukozyten enthalten waren, wurde in Kulturflaschen mit Gummidichtung und Schraubverschluß (Höhe: 45 mm, Durchmesser: 35 mm) pipettiert. Anschließend

wurde durch Zugabe von leukozytenfreiem Plasma das Volumen der Leukozytensuspension in den Kulturflaschen auf 3 ml erhöht. Durch den Zusatz von 7 ml synthetischem Nährmedium (TC 199 Difco) mit 0,26 mg/ml Penizillin und 0,2 mg/ml Dihydrostreptomycin enthält schließlich jede Kultur 10 ml Medium (30 % autologes Plasma und 70 % synthetisches Nährmedium) sowie 10^6 Leukozyten pro ml Medium.

Die Bebrütungsdauer bei $37,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ betrug 72 Stunden. 24 Stunden, bei einigen Versuchen auch 12 bzw. 6 Stunden vor Abbruch wurden die getesteten Zytostatika zugesetzt. Die Kontrollen erhielten entsprechende Volumina des Lösungsmittels (Aqua bidest.). Vier Stunden vor Abbruch wurden 0,004 mg/ml Desazetylmethylkolchizin zur Blockierung der Mitosen in der Metaphase appliziert.

Bearbeitung der Kulturen:

Nach Waschung der Zellen mit vorgewärmter Hanks-Lösung erfolgte die hypotonische Vorbehandlung in Aqua dest. (2 : 1), insgesamt 10 Minuten. Durch die Quellung der Zellen wird später eine bessere Ausbreitung der Metaphasen erzielt. Der nach dem Zentrifugieren (600 UpM, 5 Min.) verbleibende Überstand wurde möglichst weitgehend mit einer Pasteurpipette entfernt und frisch angesetztes Fixiermittel (Eisessig:Methylalkohol, abs. = 1:3) zugegeben. Nach 30 Min. wurden die Zellen resuspendiert und 0,5 - 0,7 ml der Suspension auf eisgekühlte Objektträger bei Schräghaltung aufgetropft. Spätestens nach einer Minute soll das Präparat bei leichter Erwärmung über der Gasflamme trocken sein (Lufttrockentechnik). Die Färbung erfolgte mit einer zwei-prozentigen Orzeinlösung in 50 %iger Essigsäure.

Jeweils 100 gut ausgebreitete Metaphasen wurden in jeder einzelnen Kultur visuell bei 1280-facher Vergrößerung bewertet. Als Maßstab der chromosomalen Schädigung wurden die sichtbaren Chromosomenmutationen betrachtet und entsprechend den auf S. 11 ff. dargestellten Kriterien quantitativ erfaßt.

Bewertung der Chromosomenanomalien

Bewertet wurden folgende Chromosomenaberrationen:

1. Chromatidbrüche

Als Chromatidbrüche wurden vollständige Unterbrechungen der Chromatide angesehen, bei denen sich der Bruchspalt als optisch leer erwies und bei denen in den meisten Fällen eine wenn auch vielfach geringe Dislokation des Bruchstücks nachweisbar war. In einzelnen Fällen war eine Abgrenzung von sekundären Konstriktionen nicht möglich, diese Veränderungen wurden unter der Bezeichnung "nicht klassifizierbare Brüche" aufgeführt. Da es fraglich ist, ob die sog. achromatischen Läsionen echte Brüche darstellen, wurden diese nicht als Brüche gezählt und lediglich in vereinzelt Zweifelsfällen ebenfalls den "nicht klassifizierbaren Brüchen" zugerechnet. Chromatidbrüche wurden als ein Bruchereignis bewertet.

2. Isochromatidbrüche und Chromosomenortiche

Zu diesen wurden Strukturunterbrechungen beider Chromatide eines Chromosoms etwa in gleicher Höhe gerechnet, in manchen Fällen wird es sich um Brüche im Bereich der sister loci gehandelt haben. Da bei der gegebenen Versuchsanordnung mit der maximalen Einwirkungszeit von 24 Stunden des jeweiligen Zytostatikums lediglich Isochromatidbrüche zu erwarten waren, wurden jeweils 2 Brüche angenommen.

3. Fragmente

Als Fragmente wurden isolierte einzelne oder doppelte azentrische Bruchstücke angesehen.

Einzelne Fragmente wurden als ein Bruchereignis, gedoppelte Fragmente als zwei Bruchereignisse gewertet. Für die Entstehung der Fragmente gilt Ähnliches wie unter 2.

4. Interchanges oder Translokationen (reziproke)

Sie entstehen aus der Vereinigung zweier Bruchenden von verschiedenen homologen oder nicht homologen Chromosomen. Dabei bilden sich meist drei- oder vierarmige Translokationsfiguren. Die Bruchfrequenz dieser Interchanges ließ sich mehrfach nicht bestimmen. Die mittlere Bruchfrequenz der analysierbaren Interchanges betrug etwa 2,8. Die Bruchfrequenz der nicht analysierbaren Interchanges wurde dadurch geschätzt, daß deren Zahl mit diesem empirisch gewonnenen Faktor multipliziert wurde. Es ist allerdings möglich, daß die Bruchzahl derartiger, nicht analysierbarer Interchanges um ein Geringes höher ist, da es sich vereinzelt um komplizierte Gebilde handelte. Für die quantitative Analyse ist dies jedoch nicht von Bedeutung.

E r g e b n i s s e

T h i o t e p a:

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Kontrollkulturen sind in Tabelle 1 niedergelegt. Die relativ hohe Bruchfrequenz der Kontrollen könnte auf den Zusatz von Aqua bidestillata zurückzuführen sein, der jeweils zum selben Zeitpunkt des Zytostatikumzusatzes erfolgte.

Tabelle 1

Quantitative Chromosomenanalyse der Kontrollkulturen

			<u>Bruchfrequenz</u>						
Chromatidbrüche	3	3	7	4	3	5	4	2	3
Isochromatid- u. Chromosomenbrüche	-	-	2	-	-	-	-	-	-
Fragmente - azentrische einzelne	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	1	-	-	-	1	1	1	2
Interchanges	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Bruchfrequenz	-	2	-	-	-	-	-	-	-
nicht klassifizierbare Brüche	1	1	2	1	-	-	-	-	-
Strukturanomalien/Zelle	q05	q08	q11	q05	q03	q06	q05	q03	q05
Strukturanomalien in % der betroffenen Metaphasen	5	6	10	4	3	5	5	3	4
Chromatidbrüche	5	3	3	3	5	4	5		
Isochromatidbrüche u. Chromosomenbrüche	-	2	2	-	2	-	2		
Fragmente - azentrische einzelne	-	-	2	-	-	-	2		
	1	1	-	-	1	-	-		
Interchanges	-	-	-	-	-	-	-		
Bruchfrequenz	-	-	-	-	-	-	-		
nicht klassifizierbare Brüche	-	-	-	1	-	1	1		
Strukturanomalien/Zelle	q06	q06	q07	q04	q08	q05	q1		
Strukturanomalien in % der betroffenen Metaphasen	6	5	5	4	7	5	8		

=====

Die Tabelle 1 läßt somit erkennen, daß bei 16 Kontrollkulturen die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase zwischen 0,03 und 0,11 lag. Der Prozentsatz der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen lag zwischen 3 und 10.

Bei dem Zusatz der alkylierenden Substanz Thiotepa zu den Kulturen waren strukturelle Chromosomenanomalien zu erwarten, die in der Tabelle 2 aufgestellt worden sind.

Thiotepa wurde den Leukozytenkulturen in einer Konzentration von 0,3, 3, 10, 30, 70 und 100 gamma pro ml Kulturmedium zugesetzt. Die Tabelle läßt einen dosisabhängigen Anstieg der Bruchfrequenzen erkennen, der bereits bei der niedrigsten Konzentration von 0,3 gamma Thiotepa/ml Kulturmedium erkennbar wird. Bei einer Konzentration von 30 gamma/ml Kulturmedium war eine größere Schwankung der Ergebnisse zu beobachten, deshalb wurden insgesamt 8 Kulturen ausgewertet. Es konnte nicht geklärt werden, warum bei dieser Konzentration zum Beispiel die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase zwischen 1,3 und 3,2 schwankte. Viel eher wäre dies bei den höheren Konzentrationen zu erwarten gewesen, wo ein größerer Bewertungsfehler allein schon durch die geringere Zahl der ausgewerteten Metaphasen zu erwarten gewesen wäre. Hier konnten wegen der hochgradigen Verminderung des Metaphasenindex jeweils nur zwischen 11 und 51 Metaphasen gefunden werden. Wurden die Ergebnisse jedoch auf 100 Zellen berechnet, so ergaben sich hier vergleichbare Werte. Der Prozentsatz der von Schäden betroffenen Metaphasen zeigt jedoch eine bessere Übereinstimmung in den jeweiligen dosisgleichen Ansätzen. Natürlich war die Zahl der nicht sicher zu klassifizierenden Chromosomenanomalien bei höheren Dosen größer als bei niedrigen. Die Bruchzahl ließ sich dabei nur annähernd angeben. Bei der quantitativen Bewertung fallen diese Veränderungen jedoch nicht in erheblichem Ausmaß ins Gewicht.

Strukturelle Chromosomenanalyse Thiotepa-behandelter Leukozytenkulturen

	Thiotepa																									
	0,3			3			10				30			70				100								
Chromatidbrüche	8	5	8	8	31	28	21	22	53	91	92	88	99	162	171	98	124	194	128	220	226	120	109	83	120	67
Isoschromatid- und Chromosomenbrüche	-	-	-	2	4	10	2	16	2	8	4	6	6	18	16	4	16	22	8	14	14	24	16	14	18	10
Fragmente acentrischer Einzelne	-	2	-	-	4	8	4	4	4	6	4	4	14	8	4	10	14	6	10	12	12	10	8	10	6	
Interchanges	1	1	-	1	5	4	2	6	5	1	3	-	1	6	11	5	4	9	2	3	7	4	4	4	2	
Bruchfrequenz ca. nicht klassifizierbare Brüche ca.	2	2	-	2	13	10	5	16	13	4	9	-	3	18	26	14	10	22	5	7	18	12	13	10	12	
Mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase	0,1	0,1	0,1	0,1	0,6	0,7	0,4	0,7	0,8	1,2	1,3	1,1	1,3	2,2	2,4	1,5	3,2	2,7	1,7	2,8	6,1	6,4	6,8	5,1	9,5	
Prozentsatz der von Brüchen betroffenen Metaphasen	10	8	10	10	40	50	31	43	51	60	59	60	64	76	84	68	89	87	71	75	94	89	88	81	96	
Ausgewertete Zellen	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	51	34	26	27	

(* auf 100 Metaphasen umgerechnet)

Dies gilt auch für die nicht analysierbaren Interchanges, deren Bruchfrequenz nach der oben angegebenen Methode geschätzt wurde. In der Tabelle 3 sind die analysierbaren und die nicht analysierbaren Interchanges zusammengestellt. Meist handelte es sich um analysierbare Formen. Selbst wenn durch die Schätzung der Bruchfrequenz der nicht analysierbaren Interchanges ein Fehler bei der quantitativen Bewertung nicht zu vermeiden war, so ist dieser selbst bei höherer Dosierung sehr gering. Auch war die Gesamtzahl der beobachteten Interchanges nach Thiotepa geringer als nach TEM (HAMPEL u. GERHARTZ(26)). So wurden nach TEM bei der höchsten verwandten Konzentration von 2 gamma/ml Kulturmedium zwischen 110 und 142 Interchanges beobachtet, die auf 100 Metaphasen entfielen.

Wenn man die quantitativen Ergebnisse der Chromosomenanalyse Thiotepa-induzierter Veränderungen graphisch in einem semilogarithmischen Koordinatensystem aufträgt, so ergibt sich, wie die Abbildung 3 erkennen läßt, folgendes Bild:

1. der Prozentsatz der von einem oder mehreren Brüchen betroffenen Metaphasen stieg exponentiell mit der Konzentration von Thiotepa,
2. der Mittelwert der Strukturanomalien pro Metaphase kann annähernd linear mit der Konzentration von Thiotepa ansteigen.

Wurde nun ein lineares Bezugssystem verwandt und die Ergebnisse der mittleren Bruchfrequenz pro Metaphase in Abhängigkeit von der angewandten Dosis aufgetragen, so konnte tatsächlich ein annähernd linearer Anstieg der mittleren Bruchfrequenz pro Metaphase nachgewiesen werden. Dies wurde in der Abbildung 4 dargestellt.

Tabelle 3

Quantitative Analyse der Interchanges nach Thiotepa-Zusatz

	Thiotepa μ /ml											
	0,3			3			10			30		
a) analysierbare Interchanges	1	1	-	1	1	2	1	3	4	1	3	-
Bruchfrequenz von a)	2	2	-	2	2	4	2	12	10	4	9	-
b) nicht analysb. Interchanges	-	-	-	-	4	2	1	3	1	-	-	-
errechnete Bruchfreq. v. b)	-	-	-	-	11	6	3	8	3	-	-	-

*weniger als 100 Zellen ausgezählt.

Dosisabhängigkeit struktureller Chromosomen-
anomalien nach Thiotepa - Zusatz (menschlicher
Leukozyten in vitro)

---○ Zellen mit Struktur-anomalien in %
—● Struktur-anomalien / Zelle x 10

Abbildung
3

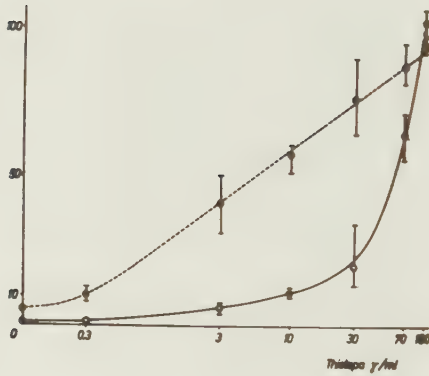
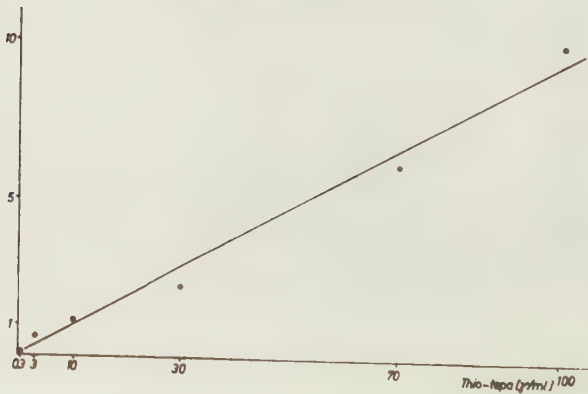


Abbildung 4

Mittlere Bruchfrequenz menschlicher Chromo-
somen unter Einwirkung von Thio-tepa.



Schon bei der quantitativen Auswertung der Kulturen war aufgefallen, daß bei höheren Thiotepa-Konzentrationen eine deutliche Mitosehemmung aufgetreten war (s.o.). Deshalb gelang es auch bei diesen Kulturen nicht, 100 Metaphasen auszuwerten. Um einen Anhalt für das Ausmaß dieser Veränderungen zu erhalten, wurden die Mitoseindices der Kontrollen und der mit Thiotepa versetzten Kulturen bestimmt. Dabei wurde der Mitoseindex jeder Kultur durch die Auszählung von jeweils 10 000 Zellen ermittelt.

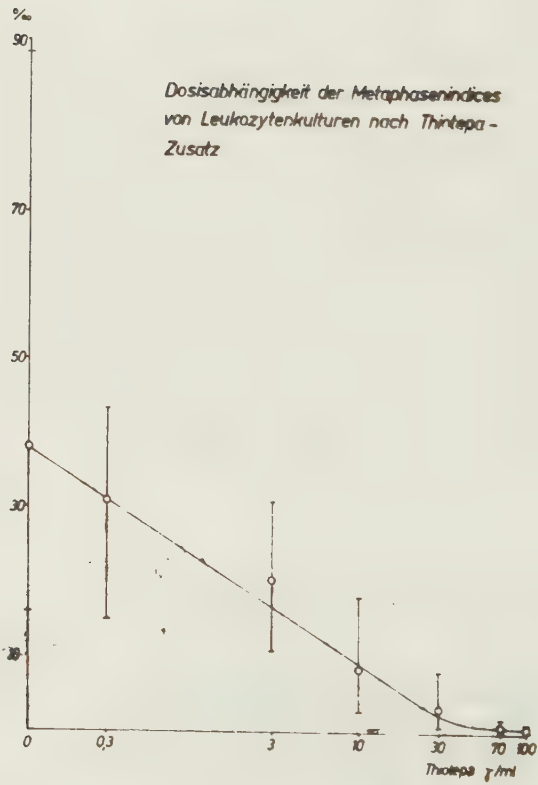
Die Tabelle 4 zeigt, daß die Kontrollkulturen eine große Schwankung der Mitoseindices aufwiesen, die sich auch durch möglichst vergleichbare Versuchsbedingungen nicht beeinflussen ließ. An Hand der Durchschnittswerte erkennt man aber doch einen deutlichen, dosisabhängigen Rückgang der Mitoseindices unter der Einwirkung von Thiotepa. Dies wurde auch graphisch in der Abbildung 5 dargestellt. Obwohl dabei der Verlauf der Geraden bis zu einer Konzentration von 30 γ Thiotepa pro ml Kulturmedium für einen exponentiellen Rückgang der Mitoseindices sprechen könnte, muß wegen der erheblichen Schwankungsbreite der Meßergebnisse und wegen der geringen Zahl von insgesamt 16 bewerteten, mit Thiotepa behandelten Zellkulturen diese Frage offengelassen werden.

Tabelle 4

Mitoseindices Thiotepa-behandelter Leukozytenkulturen in %.

Thiotepa [γ /ml]	Mitoseindices	Durchschnittswerte
100	1:1	1
70	2:0	1
30	5:3	3.3
10	10:7	8
3	21:10	20
0.3	29:14	31.3
Kontrollen	51:35	38

Abbildung 5



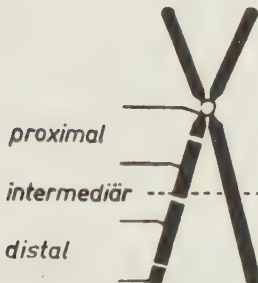
Zur Klärung der Frage, ob Chromatidbrüche nach Thiotepa gleichmäßig oder ungleichmäßig verteilt in den Chromosomen vorkommen, wurden Lokalisationsuntersuchungen durchgeführt.

Die Chromatide wurden in drei gleichgroße Abschnitte eingeteilt: (s. Abbildung 6)

1. proximal vom Zentromer
2. distal vom Zentromer
3. sowie ein intermediärer Abschnitt

Bei den Chromosomen bzw. Chromosomengruppen 1, 2, 4-5, 6-12,X, wurden lange und kurze Arme unterschieden, bei Chromosomen mit medianem Zentromer (Nr. 3, 19-20) konnte keine Unterscheidung getroffen werden, sie erhielten in der Abbildung 7 das Symbol $\pm$, bei den Chromosomen der Gruppe 13-15 16, 17-18 und 21-22 u. Y wurden nur Brüche in den langen Armen bewertet. Veränderungen in den kurzen Armen dieser Chromosomen waren aus technischen Gründen nicht sicher zu beurteilen. Der entstehende Bewertungsfehler ist sehr gering, da Brüche in den kleinen Chromosomen nur selten beobachtet wurden.

Abbildung 6



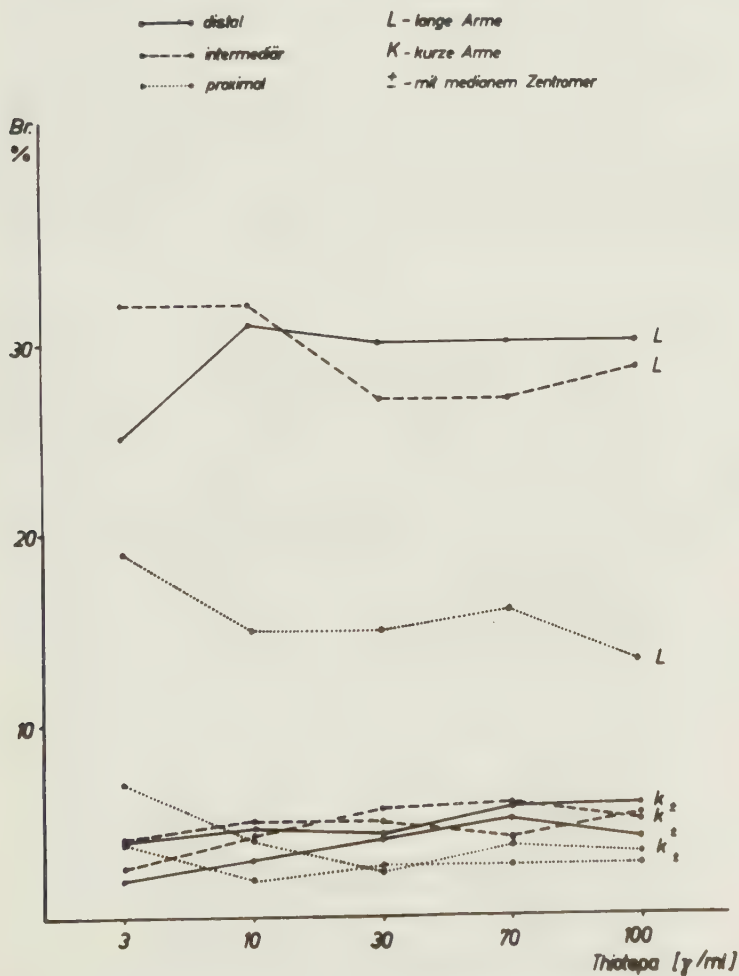
(aus HAMPEL u. GERHARTZ (26))

Die Lokalisation der Chromatidbrüche erfolgte nur in solchen Metaphasen, die keine Interchanges aufwiesen. Die Auswertung fand visuell statt, dabei konnte keine Unterscheidung der einzelnen Chromosomen durchgeführt werden. In der Abbildung 7 sind daher summarisch die Bruchzahlen in den genannten drei Abschnitten (proximal, intermediär und distal) aufgetragen. Diese summarischen Bruchzahlen wurden in Abhängigkeit von der Thiotepa-Konzentration dargestellt.

Die Abbildung 7 zeigt, daß etwa 70 Prozent aller Brüche in den langen Armen der Chromosomen auftraten. Hierbei wurden vorwiegend die distalen und intermediären Abschnitte von Brüchen betroffen, während Brüche in den proximalen Abschnitten vergleichsweise selten auftraten. Wegen der geringen Bruchzahl, die insgesamt nach der niedrigsten Thiotepa-Konzentration von 3 gamma/ml Kulturmedium auftrat, es handelt sich nur um 32 Chromatidbrüche, können die Ergebnisse zufällig sein. Bei der Konzentration von 10 gamma pro ml Kulturmedium konnten bereits 102 Brüche ausgewertet werden, bei höheren Konzentrationen mehrere hundert Brüche. Verlässliche Ergebnisse ließen sich somit erst bei einer Konzentration von 30 gamma/ml Kulturmedium und mehr erzielen. Hierbei zeigte sich nun, daß die distalen Abschnitte am häufigsten von Brüchen betroffen wurden. Hier waren über 30 % der Brüche zu beobachten, während die intermediären Segmente der Chromatide unter 30 % aller Brüche aufwiesen. Wegen der geringen Chromatinmasse der kurzen Arme und der Chromosomen mit medianem Zentromer im Vergleich zu der Chromatinmasse der gesamten Metaphase waren Brüche in diesen Segmenten und Chromosomen wie auch in den kleinen Chromosomen der Gruppen 16, 17-18, 19-20, 21-22, Y vergleichsweise selten. Deswegen konnte hier keine verlässliche Aussage gemacht werden, in welchen Abschnitten die Brüche bevorzugt auftraten.

Abbildung 7

Lokalisation Thiotepa - induzierter Chromatid- brüche menschlicher Leukozyten in vitro



Während in den vorhergehenden Versuchen die Chromosomenaberrationen quantitativ bei verschiedenen Konzentrationen von Thiotepa bewertet wurden, war es nun interessant, die Verhältnisse bei gleicher Konzentration jedoch verschiedener Einwirkungszeit des Zytostatikums zu studieren.

Bisher betrug die Einwirkungszeit, d.h. die Zeit vom Zusatz des Thiotepa bis zum Abbruch der Kulturen 24 Stunden. Es war nun zu erwarten, daß die Zeitdauer der Einwirkung dieses Pharmakons auf sich teilende Zellen *in vitro* auch bedeutsam für die Zahl der induzierten Strukturanomalien der Chromosomen sein kann. Thiotepa wurde daher 24, 12 und 6 Stunden vor Abbruch der Kulturen zugesetzt und die Zahl der Strukturanomalien nach diesen Zeiten bestimmt. Es war zu erwarten, daß bei kürzeren Einwirkungszeiten weniger Strukturanomalien auftraten.

Tabelle 4

Strukturelle Chromosomenanalyse Thiotepa-behandelter Leukozytenkulturen bei einer Konzentration von 10 γ /ml

	Einwirkungszeit Std					
	24		12		6	
Chromatidbrüche	69	69	24	23	9	14
Isochromatid- und Chromosomenbrüche	19	5	1	1	-	1
Fragmente azentr. einzelne	4	8	1	2	-	1
	5	10	2	2	2	-
Interchanges und Intrachanges	7	1	1	1	-	-
Bruchfrequenz ca.	28	4	2	2	-	-
nicht klassifizierbare Brüche ca.	3	2	-	-	1	-
Strukturanom/Zelle	13	1.1	0.3	0.3	0.1	0.2
Strukturanomalien in % der Zellen	51	55	24	22	11	13
ausgewertete Zellen	100	100	100	100	100	100

Aus der Tabelle 4 geht hervor, daß bei 12-stündiger Einwirkung von Thiotepa nur etwa die Hälfte und bei 6-stündiger Einwirkung nur etwa $1/4$ bis $1/5$ der Metaphasen von Strukturanomalien betroffen wurden im Vergleich zu den Ergebnissen bei einer 24-stündigen Einwirkungszeit. Die mittlere Zahl der Strukturanomalien pro Zelle betrug nur etwa $1/4$ des 24-Stundenwertes. Die Deutung dieser Befunde ist schwierig. Eine lineare Abhängigkeit des Ausmaßes der Chromosomenanomalien von der Einwirkungszeit ist unwahrscheinlich. So ist z.B. bekannt, daß bestimmte Mitosestadien z.B. die DNS-Synthese-Phase für das Auftreten von Brüchen disponieren, während das Gegenteil für die späte prämitotische Ruhephase und für die Mitose selbst gilt. Auf der anderen Seite ist aber auch zu berücksichtigen, daß es sich bei der angewandten Versuchsanordnung nicht um synchronisierte Zellkulturen handelt. Vielmehr ist eine Mischpopulation von Zellen in verschiedenen Mitosestadien vorhanden. Man kann daher nur unter Vorbehalt annehmen, daß bei kürzeren Einwirkungszeiten des Zytostatikums zunehmend weniger sich teilende Zellen vorhanden sind, die für Chromosomenveränderungen durch Zytostatika "empfindlich" sind. Für diese Annahme spricht auch der scheinbar lineare Abfall des Prozentsatzes der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen, während jedoch der Mittelwert der Strukturanomalien pro Metaphase sicher nicht linear mit der Einwirkungszeit abfällt.

A m e t h o p t e r i n

Im Gegensatz zu der alkylierenden Substanz Thiotepe ist Amethopterin ein Folsäureantagonist. Durch die Blockierung der Reduktion der Folsäure zur Tetrahydrofolsäure kommt es nicht zur Übertragung des Formylrestes auf Desoxyuridinmonophosphat. Dadurch wird dessen Übergang zu Desoxythymidinmonophosphat und damit die DNS-Synthese blockiert. Es sollte nun geprüft werden, ob diese Substanz ebenfalls Chromosomenveränderungen in vitro hervorruft.

Aus der Tabelle 5 ist aber zu entnehmen, daß auch bei einer maximalen Konzentration von 100 gamma/ml Amethopterin weder eine Steigerung des Prozentsatzes der von Struktur-anomalien betroffenen Zellen noch der mittleren Bruchfrequenz pro Metaphase auftrat.

Bei diesem Ergebnis ist zu berücksichtigen, daß es sich schon wegen des autologen Plasmas nicht um ein Folsäure-freies Medium gehandelt hat. Die Verhältnisse ließen sich aber auch bei Anwendung maximaler Konzentrationen reproduzieren. Es wurden noch 4 weitere Kulturen, die 100 gamma/ml Kulturmedium erhalten hatten, auf Chromosomenveränderungen durchgesehen. Obwohl eine quantitative Auswertung nicht erfolgte, traten bei diesen Kulturen Chromosomenveränderungen in nennenswertem Umfange ebenfalls nicht auf.

Auf diese Befunde soll in der Diskussion näher eingegangen werden.

D i s k u s s i o n

Strukturanomalien der Chromosomen menschlicher Leukozyten durch Thiotepa waren auf Grund der Ergebnisse bei anderen alkylierenden Substanzen zu erwarten. Wie TEM besitzt Thiotepa drei funktionelle Äthyleniminingruppen. Wenn man die quantitativen Ergebnisse der Chromosomenveränderungen beider trifunktioneller Verbindungen miteinander vergleicht, so findet man, daß gleiche Konzentrationen beider Pharmaka keinesfalls auch annähernd gleiche Chromosomenveränderungen verursachen. Nach HAMPEL u. GERHARTZ(26) waren 98 - 100 % der Metaphasen von Chromosomenanomalien betroffen, wenn 2 gamma/ml TEM den Kulturen zugesetzt wurden. Die vorliegenden Ergebnisse mit Thiotepa ergaben, daß diese maximalen Veränderungen erst bei etwa 100 gamma/ml Thiotepa auftraten. Man könnte auch sagen, Thiotepa ist schwächer mutagen wirksam als TEM in vitro. Wir müssen daher folgern, daß nicht allein die Zahl der Äthyleniminingruppen für das Ausmaß der chromosomalen Schädigung verantwortlich zu machen sind.

Die quantitative Auswertung von Chromosomenveränderungen hat in Bezug auf die Genauigkeit der Ergebnisse gewisse Grenzen, auf die bereits oben verwiesen wurde. Dies gilt besonders für die Bruchfrequenz der Interchanges wie auch für einzelne, nicht sicher klassifizierbare Chromosomenveränderungen. Es ist nämlich im Einzelfalle nicht immer möglich, gaps d.h. sekundäre Konstriktionen und echte Brüche mit Sicherheit zu unterscheiden. Diese Unsicherheitsfaktoren sind jedoch nicht so ausgeprägt, als daß sie die quantitativen Ergebnisse in nennenswertem Umfange beeinflussen könnten. Die relativ hohe Bruchfrequenz der Kontrollkulturen könnte auf den Lösungsmittelzusatz zurückzuführen sein, ist jedoch auch wiederum ein Hinweis, daß mit dieser Methode nur stark wirksame Mutagene getestet werden können.

Lokalisationsuntersuchungen der durch Thiotepa induzierten Brüche haben ergeben, daß die Verteilung dieser Brüche nicht gleichmäßig ist. Die distalen und intermediären Abschnitte der langen Arme wurden häufiger betroffen als die proximalen. Die ungleichmäßige Verteilung von Brüchen nach der alkylierenden Substanz Stickstofflost wurde bei *Vicia faba* von FORD(25), LOVELESS u. REVELL(39) und von REVELL(58) beschrieben. Die Brüche kamen vorwiegend in den Abschnitten mit hohem Heterochromatingehalt vor. Während bei menschlichen Leukozyten Brüche nach Streptonigrin (COHEN(18)) und Mitomycin C (COHEN u. SHAW(19)) vorwiegend in den Abschnitten der sekundären Konstriktionen gesehen wurden, zeigten KIHLMAN, NICHOLS u. LEVAN(35), daß Brüche nach Desoxyadenosin und Zytosinarabinosid besonders die distalen Chromosomenabschnitte betrafen. Ähnliche Befunde erhoben auch HAMPEL u. GERHARTZ(26) bei Triäthylenmelamin. Nun ist es aber erstens fraglich, ob die heterochromatinreichen Abschnitte menschlicher Chromosomen mit den sekundären Konstriktionen übereinstimmen. Zweitens sind die sekundären Konstriktionen z.B. der Chromosomen Nr. 1 und 2 wie auch 9 nicht in den distalen und intermediären, sondern in den proximalen Abschnitten der langen Arme. Die Verteilung der Brüche nach Thiotepa, FEM, Desoxyadenosin und Zytosinarabinosid kann also nicht die Abschnitte der sekundären Konstriktionen bevorzugen. Eine Erklärung für die gefundene Bruchverteilung ist z.Zt. noch nicht möglich. Man kann sich lediglich vorstellen, daß Brüche in den kleinen Chromosomen deswegen selten gefunden wurden, weil sie häufig wegen der Kürze der Chromatide schlecht sichtbar waren. Endgültiges läßt sich jedoch noch nicht aussagen, da die Bruchverteilung lediglich summarisch registriert wurde, d.h. ohne die Untersuchung der einzelnen Chromosomen bzw. Chromosomengruppen.

In den seltenen Fällen, in denen trotz einer malignen Erkrankung eine Schwangerschaft auftritt, müßte man bei der Verordnung von alkylierenden Zytostatika sehr zurückhaltend sein, da die Gefahr der Keimschädigung wie auch der Gonaden sehr groß ist. Auf diesen Umstand hat bereits LÜERS im Jahre 1955 verwiesen (40).

Amethopterin induzierte auch bei maximalen Konzentrationen keine Chromosomenbrüche. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von LÜERS u. RÖHRBORN bei *Drosophila* (43). Nun erscheint diese Tatsache zunächst überraschend, da eine strukturell sehr ähnliche Substanz - Aminopterin (Formel S.8) - die sich nur durch eine Methylgruppe von Amethopterin unterscheidet, bei *Vicia faba* Chromosomenbrüche induziert (TAYLOR(62)).

Daß Strukturveränderungen der Chromosomen bei der hier verwandten Versuchsanordnung bei menschlichen Zellen nicht auftraten, könnte durch den Folsäuregehalt des Kulturmediums bedingt sein. Folsäure wird auch als Antidot von Amethopterin bei der klinischen Anwendung beschrieben, sofern es in unmittelbarem Anschluß an die Amethopteringabe verabfolgt wird. Es könnte also möglich sein, daß die den Kulturen zugesetzte maximale Amethopteringabe von 100 gamma/ml Kulturmedium zu gering war, bzw. durch den Folsäuregehalt des Mediums "kompensiert" wurde. Dies ist jedoch nicht wahrscheinlich, wenn man einen Dosisvergleich anstellt. Setzt man voraus, daß ein Zytostatikum in vivo sich gleichmäßig in 10 l Lösungswasser verteilt und vernachlässigt man die Ausscheidung und chemische Umwandlung der Substanz für eine Zeitspanne von 24 Stunden, so entspricht eine therapeutische Einzeldosis von 2 mg TEM intravenös etwa einer Konzentration von 0,2 gamma/ml Kulturmedium TEM in vitro. Natürlich sind die Ergebnisse in vitro nicht auf die Folgen von TEM in vivo übertragbar. Die therapeutische Dosis eines Zytostatikums in vivo kann aber mit gewissen Einschränkungen als Anhaltspunkt

für dessen zytogenetische Wirkung in vitro gelten. Die zehnfache TEM-Dosis von 2 gamma/ml in vitro führte bereits wie oben erwähnt zu maximalen Chromosomenveränderungen. Da nun nicht nur das Kulturmedium sondern in vivo auch das menschliche Serum Folsäure enthalten, konnte die therapeutische Dosis des Amethopterin mit der anzuwendenden Konzentration in vitro grob verglichen werden. Geht man von einer therapeutischen Einzeldosis von 10 mg Amethopterin i.v. aus, so ist die entsprechende Konzentration in vitro berechnet nach dem obigen Schema 1 gamma/ml Kulturmedium. Nun wurde nicht nur die 10-fache, sondern die 100-fache Konzentration in vitro getestet. Deshalb scheint Amethopterin tatsächlich Chromosomenbrüche nicht in erheblichem Umfang zu verursachen. Natürlich müßte dieser Befund erst mit Hilfe eines folsäurefreien Mediums kontrolliert werden. Das Medium dürfte dann keinen Plasmazusatz enthalten. Die Kultivierung menschlicher Leukozyten gelingt dann allerdings nicht.

Eine andere mögliche Erklärung wäre, daß Amethopterin im Gegensatz zu anderen Zytostatika sich teilende Zellen weniger stark beeinträchtigt. In vivo ist dies allerdings nicht der Fall. Bei höherer Dosierung, wie sie z.B. bei der Therapie des Chorionepithelioms erforderlich ist (50 mg/die für 4-5 Tage) kommt es gerade zur Beeinträchtigung von Geweben mit hoher Mitoserate (Knochenmark, Schleimhautepithel, Haarboden).

Auch könnte man annehmen, daß Amethopterin nicht die eigentliche "Wirkform" darstellt und daß analog dem Zyklophosphamid erst in vivo eine Strukturänderung erfolgt, wobei die eigentliche aktive Substanz entstehen würde.

Es muß daher offenbleiben, warum Amethopterin in vitro keine Chromosomenveränderung induzierte.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Thiotepa und Amethopterin wurden an menschlichen Leukozyten in vitro getestet und Chromosomenaberrationen quantitativ erfaßt. Während Thiotepa konzentrationsabhängige Chromosomen-schädigungen verursachte, konnte dies bei der gewählten Versuchsanordnung bei Amethopterin nicht nachgewiesen werden. Neben der Konzentration war auch die Zeit der Einwirkung des Zytostatikums von Bedeutung. Die summarisch erfaßte Verteilung der Brüche war nach Thiotepa ungleichmäßig über drei gleichgroßen Chromatidabschnitten, wobei die distalen und intermediären Brüche weitaus überwogen.

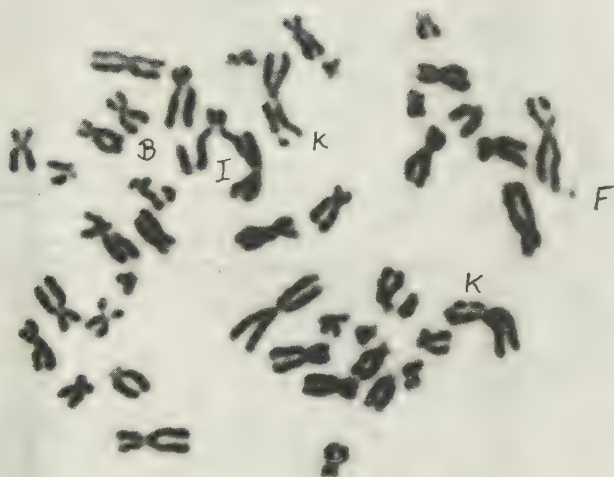


Abbildung 7:

Metaphase einer mit Thiotepa versetzten

Leukozytenkultur (10 gamma/ml Kulturmedium)

B: Chromatidbruch, **F:** Fragment, **I:** Interchange

K: sekundäre Konstriktionen

Vergr.: 3000

Foto: Dr. K.E. Hampel

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) ABAD, R: Estudio de las alteraciones cromosómicas producidas por los citostáticos. Acta oncol. 4 3-23 (1965)
- 2) ARRIGHI, F.E. u. HSU, T.C.: Experimental alteration of metaphase chromosome morphology. Effect of actinomycin D. Exp.Cell Res. 39, 305-308 (1965)
- 3) ARRIGHI, F.E., HSU, T.C. u. BERGSAGEL, D.E.: Chromosome damage in murine and human cells following cytoxan therapy. Texas Rep.Biol.Med. 20, 545-549 (1962)
- 4) AUERBACH, C.: D.melanogaster: New mutants. Chemically induced mutations and rearrangements. Dros.Inform.Serv. 17, 48-50 (1943)
- 5) AUERBACH, C. u. FALCONER, D.S.: A new mutant in the progeny of mice treated with nitrogen mustard. Nature 63, 678-679 (1949)
- 6) AULA, P.: Chromosome breaks in leukocytes of chickenpox patients. Preliminary communication. Hereditas 49, 451-453 (1963)
- 7) BATEMAN, A.J.: The induction of dominant lethals in rats and mice by triethylenemelamine. Genet. Res. 1, 381-392 (1960)
- 8) BELITZ, H.J.: Chromosomenfragmente, Minutes und sichtbare Mutationen bei Drosophila nach Behandlung mit Chinon I. Z.Vererbungsl. 90, 223-230 (1959)
- 9) BELL, A.G. u. BAKER, D.G.: Irradiation-induced chromosome aberrations in normal human leukocytes in culture. Canad.J.Genet.Cytol. 4, 340-351 (1962)
- 10) BELL, S. u. WOLFF, S.: Studies on the mechanism of the effect of fluorodeoxyuridine on chromosomes. Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.) 51, 195-202 (1964)
- 11) BENDER, M.A. u. Types and rates of X-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated in vitro. Proc.nat.Acad.Sci.(Wash) 48, 522-532 (1962)

- 12) BENDER, M.A. u.
GOOCH, P.C.: Chromatid-type aberrations induced by X-rays in human leukocyte cultures.
Cytogenetics 2, 107-116 (1963)
- 13) BIRD, J.: The production of mutations in *Drosophila* using two classes of compounds, the "aromatic nitrogen mustards" and the epoxides.
Heredity, 4, 273 (1950)
- 14) BÖÖK, J.A.,
FRACCARO, M.,
FREDGA, K. u.
LINDSTEN, J.: Radiation induced chromosome aberrations in human foetal cells grown in vitro.
Acta Genet.Med.Gemellol. 9, 356-389 (1962)
- 15) BUIATTI, M. u.
RONCHI, V.N.: Chromosome breakage by triethylenemelamine (TEM) in *Vicia faba* in relation to the mitotic cycle.
Caryologia 16, 397-403 (1963)
- 16) CATTANACH, B.M.: Induction of translocations in mice by triethylenemelamine.
Nature 180, 1364-1365 (1957)
- 17) CHU, E.H.Y.,
GILES, N.H. u.
PASSANO, K.: Types and frequencies of human chromosome aberrations induced by X-rays.
Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.) 47, 830-839 (1961)
- 18) COHEN, M.M.: The specific effects of streptonigrin activity on human chromosomes in culture.
Cytogenetics 2, 271-279 (1963)
- 19) COHEN, M.M. u.
SHAW, M.W.: Effects of mitomycin C on human chromosomes.
J.Cell Biol. 23, 386-395 (1964)
- 20) COHEN, M.M.,
SHAW, M.W. u.
CRAIG, A.P.: The effects of streptonigrin on cultured human leukocytes.
Proc.nat.Acad.Sci. 50, 16-24 (1963)
- 21) COHEN, P.E. u.
LANSKY, G.S.: Chromosome damage during nitrogen mustard therapy.
Brit.med.J. 2, 1055-1057 (1961)
- 22) DENVER STUDY GROUP: A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes.
J.Am.med.Ass. 174, 159-162 (1960)

- 23) FAHMY, O.G. u.
FAHMY, M.J.: Cytogenetic analysis of the actions of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*.
III. Chromosome structural changes induced by 2:4:6-tri (ethylene-imino) 1:3:5-triazine.
J.Genet. 53, 181-199 (1955)
- 24) FAHMY, O.G. u.
FAHMY, M.J.: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*.
VI. The mutagenic cell stage response of the male germ line to the 'nitrogen mustard' derivatives of amino acids, carboxylic acids and amines.
Genet. Res. 1, 173-188 (1960)
- 25) FORD, C.E.: Chromosome breakage in nitrogen mustard treated *Vicia faba* root tip cells.
Proc. 8th Int. Congr. Genet. 1948
Hereditas, Suppl. 570-571 (1949)
- 26) HAMPEL, K.E. u.
GERHARTZ, H.: Strukturanomalien der Chromosomen menschlicher Leukozyten in vitro durch Triäthylenmelamin.
Exp. Cell. Res. 37, 251-258 (1965)
- 27) HAMPEL, K.E. u.
LEVAN, A.: Breakage in human chromosomes induced by low temperature.
Hereditas 51, 315-343 (1964)
- 28) HEILMEYER, L.: Grundlagen und Praxis chemischer Tumorbehandlung.
E. Pirwitz, Heidelberg, 1954
- 29) JACKSON, J.F.: Polyploidy and endoreduplication in human leukocyte cultures treated with β -mercaptoethanol.
Exp. Cell Res. 31, 194-198 (1963)
- 30) JACKSON, J.F.: Chromosome aberrations in cultured human leukocytes treated with 8-ethoxycaffeine.
J. Cell Biol. 22, 291-293 (1964)
- 31) JACKSON, J.F. u.
LINDAHL-KIESLING, K.: Polyploidy and endoreduplication in human leukocyte cultures treated with β -mercaptopyruvate.
Science 141, 424-425 (1963)
- 32) KIHLMANN, B.A.: Different effects of 5-fluorodeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine on the frequencies of chromatid aberrations obtained in *Vicia faba* after irradiation with X-rays.
Exp. Cell Res. 27, 604-607 (1962)

- 33) KIHLMAN, B.A.: The production of chromatid aberrations by 5-fluorodeoxyuridine alone and in combination with X-rays and 8-ethoxycaffeine.
Caryologia 15, 261-277 (1962)
- 34) KIHLMAN, B.A.: The effect of 5-halogenated deoxyuridines on the frequency of X-ray-induced chromosomal aberrations in *Vicia faba*.
Hereditas 49, 353-370 (1963)
- 35) KIHLMAN, B.A.,
NICHOLS, W. u.
LEVAN, A.: The effect of deoxyadenosine and cytosinearabioside on the chromosomes of human leukocytes in vitro.
Hereditas 50, 139-143 (1963)
- 36) KOLLER, P.C. u.
CASARINI, A.: Comparison of cytological effects induced by X-rays and aromatic nitrogen mustards.
Brit.J.Cancer 6, 173-185 (1952)
- 37) KRONE, W.,
WOLF, U. u.
FOULADWAND, B.: Einfluß mutagener Substanzen auf die Chromosomenmorphologie.
8. Tagg.dtsch.Ges.Anthropol. Köln 1963
Homo, Suppl. 46-49 (1965)
- 38) LINDGREN, M. u.
NORRYD, C.: Chromosome aberrations in one of a pair of identical twins after roentgen irradiation of the spine.
Hereditas 48, 688-698 (1962)
- 39) LOVELESS, A. u.
REVELL, S.: New evidence on the mode of action of 'mitotic poisons'.
Nature 164, 938-944 (1949)
- 40) LÜERS, H.: Zur Frage der Erbschädigung durch tumortherapeutische Cytostatika.
Z. Krebsforsch. 60, 528-538 (1955)
- 41) LÜERS, H.: Chinon I und Sanamycin im Mutationsversuch.
Naturwissensch. 43, 206 (1956)
- 42) LÜERS, H.: The mutagenicity of triethylene thiophosphoramide (Thio-Tepa).
Dros.Inf.Serv. 33, 145 (1959)
- 43) LÜERS, H. u.
RÖHRBORN, G.: Genetische Schäden durch Chemotherapeutika.
Wissen u. Praxis, Heft 22 (1961)
Dr. Lüttke-Verlag, Berlin

- 44) MERZ, T.: Effect of mitomycin-C on lateral root-tap chromosomes of *Vicia faba*. Science 133, 329-330 (1961)
- 45) MICHAELIS, A. u. RIEGER, R.: Einige experimentelle Ergebnisse zur Wirkung von Myleran auf die Chromosomen von *Vicia faba*. Züchter 30, 150-163 (1960)
- 46) MICHAELIS, A. u. RIEGER, R.: Die Induktion von Chromosomenaberrationen durch Mitomen und Endoxan bei *Vicia faba* und der Transportform-Wirkform-Mechanismus. Biol.Zentralbl. 80, 302-317 (1961)
- 47) MICHAELIS, A.u. RIEGER, R.: Interaction of chromatid breaks induced by three different radio-mimetic compounds. Nature 199, 1014-1015 (1963)
- 48) MOORE, J.G., van CAMPENHOUT, J.L. u. BRANDAMP, W.W.: Effects of ionizing irradiation and chemotherapeutic agents on human chromosomes. Am.J.Obst.Gynecol. 88, 985-1000 (1964)
- 49) MOOREHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMAN, W.J., BATTIPS, D.M. u. HUNGERFORD, D.A.: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp.Cell.Res. 20, 613-616 (1960)
- 50) MUKHERJEE, R.: Actinomycin D effects on the frequency of radiation-induced mutations in *Drosophila*. Genetics 51, 363-367 (1965)
- 51) MURPHY, M.L., MORO, A.D. u. LACON, C.: The comparative effects of five poly-funktional alkylating agents on the rat fetus, with additional notes on the chick embryo. Ann.N.Y.Acad.Sci. 68, 762-782 (1958)
- 52) NICHOLS, W.W.: In vitro chromosome breakage induced by arabinosyladenine in human leukocytes. Cancer Res. 24 1502-1505 (1964)
- 53) NICHOLS, W.W., LEVAN, A., HALL, B. u. OESTERGREN, G.: Measles-associated chromosome breakage. Hereditas 48, 367-370 (1962)

- 54) NICHOLS, W.W.,
LEVAN, A. u.
KIHLMAN, B.A.: Chromosome breakage associated with viruses and DNA inhibitors. Symp.internat.Soc.Cell Biol. 3, 255-271 (1964)
- 55) NOWELL, P.C.: Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin in human leukocyte cultures. Exp.Cell Res. 33, 445-449 (1964)
- 56) OCKEY, C.H.: A quantitative comparison between the cytotoxic effects produced by proflavine, acethylethyleneimine and triethylene melamine on root-tips of *Vicia faba*. J. Genet. 55, 525-549 (1957)
- 57) OSTERTAG, W. u.
KERSTEN, W.: The action of proflavin and actinomycin D in causing chromatid breakage in human cells. Exp. Cell Res. 39, 296-301 (1965)
- 58) REVELL, S.H.: Chromosome breakage by X-rays and radiomimetic substances in *Vicia*. Heredity 6, Suppl., 107-124 (1953)
- 59) RÖHRBORN, G.: Untersuchungen zur Frage der genetischen Wirksamkeit von Myleran an *Drosophila melanogaster*. Z.indukt.Abst.Vererbungsl. 90, 116-131 (1959)
- 60) STICH, H.F.,
HSE, T.C. u.
RAPP, R.: Virus and mammalian chromosomes. I. Localisation of chromosome aberrations after infection with herpes simplex virus. Virology 22, 439-445 (1964)
- 61) SUZUKI, D.: Studies on the chemical nature of crossing-over in *Drosophila melanogaster*. I. Preliminary results on the effect of actinomycin D. Can. J. Genet.Cytol. 5, 482-489 (1963)
- 62) TAYLOR, J.M.: Effects of inhibitors of thymidylate synthetase on chromosome breakage and reunion. Symp.Int.Soc.Cell.Biol. 2, 161-177 (1963)
- 63) TAYLOR, J.H.: DNA synthesis in relation to chromosome reproduction and the reunion of breaks. J.Cellular Comp.Physiol. 62, 73-86 (1963)

- 64) TAYLOR, J. H.,
HAUT, W.F. u.
TUNG, J.: Effects of fluorodeoxyuridine on
DNA replication, chromosome breakage
and reunion.
Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.) 48,
190-198 (1962)
- 65) TOUGH, I.M.,
BUCKTON, K.E.,
BAIKIE, A.G. u.
COURT BROWN, W.M.: X-ray induced chromosome damage in
man.
Lancet II, 849-851 (1960)
- 66) WAHRMAN, J.,
SCHAAP, T. u.
ROBINSON, E.: Manifold chromosome abnormalities
in leukaemia.
Lancet I, 1098-1100 (1962)
- 67) WAKONIG, R. u.
ARNASON, T.J.: Chromosome breakage induced in *Vicia*
*fab*a root tips by 2,4,6-triethylene-
imino-1,3,5-triazine.
Canad.J.Botany 37, 403-411 (1959)
- 68) WITTINGHILL, M.: The effects of methyl-bis (b-chloro-
ethyl)amine upon recombination values
in *Drosophila melanogaster*.
Genetics 33, 634-638 (1948)

LEBENS LAUF

Am 3. Januar 1940 wurde ich, Dieter Rösch, in Kirchheim - Teck geboren.

Nach vier Jahren Volksschule, in Bissingen - Teck, besuchte ich das Gymnasium in Kirchheim und schloss dort im Februar 1959 meine Schulausbildung ab.

Das Studium der Zahnheilkunde begann ich in Freiburg Brg. an der Albert - Ludwig Universität im selben Jahr und bestand dort am 22. Oktober 1962 die zahnärztliche Vorprüfung.

Zum 2. klinischen Semester wechselte ich nach Berlin an die Freie Universität und schloss dort mein Studium am 21. Juli 1965 mit Erfolg ab.

Seither arbeite ich in der Schweiz als zahnärztlicher Assistent.

Dieter Rösch

